

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/10, 1/21, 9/22, 15/70, C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/28451 (43) Date de publication internationale: 10 juin 1999 (10.06.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02629</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 décembre 1998 (04.12.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/15319 4 décembre 1997 (04.12.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOMETHODES (S.A.R.L.) [FR/FR]; c/o Mathématiques Partenaires S.A., 24, boulevard de l'Hôpital, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): DELCOURT, Marc [FR/FR]; 10, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
(54) Title: CLONING METHOD BY MULTIPLE DIGESTION, VECTORS FOR IMPLEMENTING SAME AND APPLICATIONS		
(54) Titre: PROCEDE DE CLONAGE PAR DIGESTION MULTIPLE, VECTEURS POUR SA MISE EN OEUVRE ET SES APPLICATIONS		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns a novel cloning method based on the systematic, combined and preparatory use of restriction sites present on the inserts constituting a complementary or genome DNA bank. The invention also concerns the applications of said method and the resulting banks.</p>		
(57) Abrégé		
<p>La présente invention concerne une nouvelle méthode de clonage fondée sur l'utilisation systématique, combinée, et préparative des sites de restriction présents sur les inserts constituant une banque d'AND complémentaire ou génomique. L'invention concerne également les applications de ce procédé ainsi que les vecteurs pour sa mise en oeuvre et les banques obtenues.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCÉDÉ DE CLONAGE PAR DIGESTION MULTIPLE,
VECTEURS POUR SA MISE EN OEUVRE ET SES APPLICATIONS.

5 La présente invention concerne le domaine de
la biologie moléculaire et se rapporte plus
particulièrement au clonage de gènes.

10 Le clonage de gènes est un domaine en pleine
expansion qui vise notamment à associer fonctions et
gènes. Ce domaine se développe principalement selon deux
grands axes, d'une part la biologie moléculaire inverse,
qui consiste à séquence de façon massive des banques
d'ADN génomiques ou complémentaires, et d'autre part la
15 biologie moléculaire directe, qui consiste à trouver la
séquence responsable d'une activité observée, comme une
activité enzymatique ou une homologie avec d'autres
gènes.

20 La présente invention vise précisément à
offrir une nouvelle méthode de clonage d'un fragment
d'acide nucléique, désignée aussi ci-après DMD pour
"Digestion Multiple Différentielle", qui repose sur
l'utilisation systématique, combinée, et préparative des
sites de restriction présents sur les inserts
constituant une banque d'ADN complémentaire ou
génomique.

25 La DMD s'applique notamment aux cas du
criblage de banques d'expression et du clonage par
homologie.

30 La présente invention trouve également des
applications dans le domaine fastidieux du séquençage
quand celui-ci n'a qu'une activité d'identification des
inserts, ainsi que dans l'étude du polymorphisme humain,
notamment dans le cadre de la recherche des
prédispositions génétiques.

35 On désignera ci-après par Caractéristique
Enzymatique (CE) la résistance, notée "r" ou la

sensibilité, notée "s", d'un fragment d'acide nucléique à une enzyme de restriction. Ce qui signifie :

- qu'un fragment qualifié "s" pour une enzyme de restriction donnée contient le site de clivage de cette enzyme, et

- qu'un fragment qualifié "r" pour une enzyme de restriction ne contient pas le site de clivage de cette enzyme.

La Caractéristique Enzymatique Multiple (CEM) est alors l'ensemble des CE obtenues pour plusieurs enzymes. On peut alors représenter la CEM d'un fragment d'ADN contenant un site Eco, un site Bam, deux sites Sca, mais pas de site Hind ni Stu, de la façon suivante: Eco^SBam^SSca^SHind^rStu^r.

Le procédé de l'invention propose donc d'associer au fragment, que l'on cherche à isoler au sein d'un échantillon, sa caractéristique enzymatique multiple (CEM). La recherche dudit fragment peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier, comme sa capacité à hybrider à une sonde nucléique, l'activité enzymatique de son produit protéique, l'expression d'une protéine que l'on pourra détecter, etc...

Le procédé de clonage selon l'invention est fondé sur la démonstration que quand le nombre d'enzymes est suffisamment grand, chaque insert de la banque possède une CEM originale, et qu'en conséquence, l'invention offre une stratégie simple de clonage des gènes à partir de leur CEM. Le procédé selon l'invention repose donc sur le balayage de banques d'ADN en utilisant de façon combinatoire la répartition des sites de restriction sur les inserts constituant cette banque.

Le principe du procédé selon l'invention repose également sur l'utilisation d'un vecteur de type

nouveau car substantiellement dépourvu de tous les sites de clivage par des enzymes de restrictions pour n'en garder que ceux nécessaires à la construction de la banque, orientée ou non, et à son éventuel sous-clonage dans un autre vecteur. Dans une forme particulière de réalisation minimale, le vecteur contient :

- un site A nécessaire pour construire la banque, et

- deux sites B, identiques et flanquant le site A, utile pour sous-cloner le gène une fois celui-ci identifié et cloné.

Cet ensemble pourra être désigné ci-après "trilinker", dont la fabrication schématique est donnée à la figure 1 en annexe.

Dans une autre forme particulière de réalisation, le vecteur contient :

- un site A et un site A', différents, pour construire la banque, et

- deux sites B et B', identiques ou différents, et flanquant les sites A et A', pour sous-cloner le gène une fois celui-ci identifié et cloné.

Avantageusement les sites B sont des sites octonucléotidiques, de façon à minimiser le risque que des sites B soient présents dans les inserts clonés. Il sera ainsi possible de sous-cloner facilement en un seul morceau.

Environ 100 enzymes de restriction à site hexanucléotidique ont été découvertes à ce jour. 70 d'entre-elles ont un site de reconnaissance de type palyndrome continu ou discontinu.

Un vecteur de l'invention, avantageusement un plasmide, ne contient plus, mis à part ces trois sites, de sites de restriction hexa ou pentanucléotidiques correspondant à des enzymes de restriction déjà identifiées ou qui le seront dans le

futur. On entend donc par "substantiellement", que cette destruction peut être partielle en ce sens qu'elle ne concerne que certains des sites connus; seules les enzymes correspondantes seront alors utilisées dans le procédé de l'invention. Dans l'exposé de l'invention qui suit, on considère, comme indiqué précédemment que environ 50 à 70 types de sites ont été détruits.

Un vecteur de l'invention peut être construit à partir d'un plasmide déjà existant et possédant toutes les fonctions nécessaires pour permettre d'y créer et d'y manipuler une banque d'ADNC ou génomique. Il peut être utile, dans le procédé de l'invention, que la banque ne contienne plus de vecteur seul refermé sur lui-même. Il est donc avantageux que le vecteur de l'invention contienne un système qui élimine tout vecteur seul refermé sur lui-même, comme un gène suicide, un système de disruption de la proximité d'un promoteur lambda ou tout autre système connu de l'homme du métier.

La technique utilisée, dans le cadre de l'invention pour détruire tous les sites de restriction est une des techniques de mutagenèse dirigée simple ou multiple déjà décrites dans l'art antérieur, ou tout autre technique connue par l'homme du métier, comme le remplacement de segments du plasmide par oligonucléotides. On obtient ainsi un vecteur résistant à 70 enzymes de restriction, numérotées de I à LXX, et sensible à 2, désignées ci-avant A et B. L'idée de détruire simultanément la majorité des sites de restriction présents sur un plasmide a été envisagée par D. H. Jones et al. (BioTechniques 1994, 16, 4 : 694) mais dans un contexte tout différent. En effet, cet article décrit la destruction par mutagenèse multiple de 31 des 37 sites d'un très petit vecteur, de façon à

créer un nouvel outil facilitant certaines manipulation de l'ADN.

5 Le procédé de l'invention est par ailleurs basé sur la création d'une banque d'ADN, laquelle selon l'application envisagée contient de 1 à 10^8 et de préférence de l'ordre de 10^5 à 4.10^6 fragments différents de l'ordre de 0,1 kb à 5 kb chacun, et de préférence, selon les applications du procédé de l'invention, de 1 à 2 kb. Dans le mode particulier de mise en oeuvre du procédé de l'invention décrit à l'exemple 6 ci-après concernant l'étude du polymorphisme, la banque peut ne comprendre qu'un seul fragment.

10
15 Ainsi, pour l'application du procédé de l'invention à la fabrication de banques d'expression ou au clonage par homologie, il a été préparé, comme représenté schématiquement à la figure 2 en annexe, une banque d'ADNc de 10^5 fragments différents de 1 kb chacun.

20
25 Toutefois, ce modèle constitue une approximation et est donc légèrement faux, car la taille des fragments est hétérogène. La taille moyenne des inserts étant sous-estimée et la taille de la banque étant surestimée, ce modèle a été choisi afin de disposer d'une base simple (homogénéité de la taille des fragments) et d'un système d'étude qui désavantage l'analyse (taille de la banque surestimée, taille des fragments sous-estimée) de façon à ce que le procédé de l'invention soit reproductible dans tous les cas.

30
35 Pour l'application du procédé de l'invention au Southern Blot d'identification et à l'étude du polymorphisme, il a été préparé, comme représenté schématiquement à la figure 3 en annexe, une banque d'ADN génomique de 4.10^6 fragments différents de 1kb chacun. Cette banque a été obtenue par l'utilisation

d'une enzyme correspondant à un site de fréquence théorique 1/1024 (de type AT(ACGT)(TGCA)TA).

5 Tous types de banques d'ADN, tels que celles obtenus par amplification au hasard par PCR utilisant des oligonucléotides dégénérés ou non, entrent dans le cadre de la présente invention.

10 En conséquence, l'invention a pour objet un procédé de clonage d'un fragment d'acide nucléique comprenant les étapes suivantes :

- on prépare une banque d'ADN susceptible de contenir ledit fragment,
- on crible ladite banque en utilisant de façon combinatoire au moins 10 et de préférence 50 à 70 enzymes de restriction, pour isoler par tout moyen approprié le clone contenant ledit fragment.

15 Dans ce procédé, la préparation de la banque d'ADN susceptible de contenir le fragment d'acide nucléique, consiste à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction à l'exception :

- d'un site pour la construction de la banque, et
- 25 - éventuellement de deux autres sites identiques, différents du premier ou des premiers site(s) et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner la séquence d'acide nucléique une fois celle-ci identifiée et clonée.

30 Dans une autre forme de réalisation de ce procédé, on insère chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction à l'exception :

- 35 - de deux sites pour la construction de la banque, orientée, et

- éventuellement de deux autres sites identiques ou non, différents des deux premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner la séquence d'acide nucléique une fois celle-ci identifiée et clonée.

5

Le procédé comprend plus particulièrement les étapes suivantes :

a) on prépare une banque d'ADN susceptible de contenir ledit fragment d'acide nucléique, consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

10

15

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner le fragment d'acide nucléique une fois celui-ci identifié et cloné.

20

L'échantillon à partir duquel sont issus les fragments constituant la banque peut être toute cellule eucaryote (mammifère, plante, levure, etc...), ou tout organisme procaryote (virus, bactérie, etc...). Il peut s'agir d'ADN génomique, d'ADNc, de fragments d'amplification par PCR ou de tout autre banque d'ADN susceptible d'être préparée par l'homme du métier.

25

b) On réalise la digestion en parallèle de la banque par plusieurs enzymes de restriction, au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction de façon à obtenir autant de banques mono-digérées que d'enzymes utilisées.

30

c) On transfecte indépendamment les banques mono-digérées dans des hôtes cellulaires appropriés de

35

façon à obtenir des lots correspondant d'hôtes cellulaires.

5 d) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (c) pour évaluer l'intégrité de la séquence d'acide nucléique à cloner et ainsi établir sa CEM.

10 En effet, si la digestion par une enzyme désignée "I" n'altère pas l'intégrité de l'insert présent dans la banque, celui-ci est considéré I^R, au contraire, si elle l'altère, celui-ci est considéré I^S.

Les étapes (a) à (d) ci-dessus permettent l'analyse du fragment à cloner selon l'invention.

15 Le procédé de l'invention comprend en outre les étapes suivantes permettant de purifier le fragment à cloner :

e) On reprend la banque totale de l'étape (a) et on la digère sensiblement simultanément par les enzymes qui n'affectent pas l'intégrité du fragment à cloner. Pour lesquelles il a donc été considéré "r".

20 f) On isole le clone résistant contenant le fragment d'acide nucléique à cloner par tout moyen approprié et éventuellement on le sous-clone en utilisant les deux sites ménagés dans le vecteur à cet effet.

25 g) On séquence éventuellement le fragment d'acide nucléique à cloner.

30 La digestion multiple de l'étape (e) a pour effet de cliver la totalité, ou la quasi-totalité, des fragments d'ADN constituant la banque, à l'exception du fragment à cloner.

35 L'isolement du clone résistant contenant le fragment d'acide nucléique à cloner de l'étape (f) peut être réalisé par transformation de la banque multi-digérée dans des bactéries compétentes, ou par PCR en

utilisant des oligonucléotides amorces flanquant le site de clonage de la banque.

5 éventuellement, par sécurité on peut effectuer des étapes de vérification entre les étape (a) et (b) d'une part, et (e) et (f) d'autre part consistant :

10 a') A vérifier la présence du fragment d'acide nucléique à cloner dans la banque en transfectant dans un hôte cellulaire qui n'a pas ledit fragment et en testant par tout moyen approprié la présence du fragment dans ledit hôte. Avantageusement, on utilise dans cette étape (a') des cellules COS, classiquement mise en oeuvre pour les transfections.

15 e') A transformer la banque multi-digérée de l'étape (e) dans des hôtes compétents de façon à vérifier la nature des fragments clonés. Par exemple, cette étape consiste à étaler sur petri et vérifier par minipréparations d'ADN plasmidique (miniprep) que les inserts sont bien sensibles aux enzymes notées "s" lors
20 de l'établissement de la CEM.

Avantageusement, la banque d'ADN préparée à l'étape (a) contient de 1 à 10^8 et de préférence de l'ordre de 10^5 à 4.10^6 fragments différents de l'ordre
25 de 0,1 kb à 5 kb chacun, et de préférence de l'ordre de 1 à 2 kb.

30 Dans le procédé de l'invention, on préfère que les deux sites de sous-clonage soient des sites octonucléotidiques, de façon à minimiser le risque que des sites B soient présents dans les inserts clonés.

Dans un mode de réalisation tout particulier du procédé de l'invention, la banque ne contient plus de vecteur seul refermé sur lui-même. Il est donc
35 avantageux que le vecteur de l'invention contienne un système qui élimine tout vecteur seul refermé sur lui-même, comme un gène suicide, un système de disruption de

la proximité d'un promoteur lambda ou tout autre système connu de l'homme du métier.

5 Les tests réalisés aux étapes (d) et (a') pour vérifier l'intégrité de la séquence d'acide nucléique à cloner peuvent être tout moyen de mise en évidence soit de la séquence elle-même, comme une sonde, soit de la protéine codée par ladite séquence, tel qu'un ligand comme un anticorps, ou encore de l'activité de
10 cette protéine, comme un marqueur enzymatique, qui peuvent être détectées par tout moyen connu de l'homme du métier, comme un marquage fluorescent ou radioactif.

15 Les applications du procédé de clonage selon l'invention sont très nombreux et l'on peut citer notamment celles détaillées dans les exemples ci-après :

- Le clonage d'un gène par banque d'expression.
- Le clonage par homologie.
- 20 - Le Southern Blot d'identification dénommé par l'Inventeur "identiblot".
- L'étude du polymorphisme.

Aussi, on désignera indifféremment dans ce qui suit par gène ou insert ou séquence, le fragment
25 d'acide nucléique à cloner selon le procédé de l'invention décrit ci-dessus.

30 Un procédé de clonage d'un gène par banque d'expression selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- a) On prépare une banque d'ADNc susceptible de contenir ledit gène en insérant ladite banque dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :
- 35 - un ou deux sites pour la construction de la banque, et

5 - éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le flanquant, utiles pour sous-cloner le gène une fois celui-ci identifié et cloné.

10 b) On vérifie la présence du gène recherché dans la banque en transfectant dans une lignée cellulaire qui n'a pas l'activité ou le phénotype recherché et en mesurant sa restauration par une technique permettant de distinguer les cellules transfectées des cellules non transfectées, par exemple par test cytométrique ou enzymatique.

15 c) On digère la banque indépendamment par au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction.

d) On transfecte indépendamment les banques mono-digérées de l'étape (c).

20 e) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (d) pour la présence de l'activité associée au gène à cloner et on évalue l'intégrité de la séquence dudit gène afin d'établir la CEM de l'activité associée audit gène.

25 On entend par activité associée au gène la détection par tout moyen de la protéine codée par ledit gène ou de l'activité de cette protéine quelle qu'elle soit (ligand, enzyme, induction de tumeur, etc...).

30 f) On reprend la banque totale de l'étape (a) et on la digère sensiblement simultanément par les environ 50 à 55 enzymes qui, en moyenne, n'affectent pas l'activité mesurée à l'étape (e). En conséquence, statistiquement, tous les fragments constituant la banque seront clivés, à l'exception du fragment recherché.

35 g) On transforme la banque multi-digérée dans des bactéries compétentes. En conséquence, seuls

les vecteurs contenant un fragment non clivé seront transformés dans les bactéries compétentes.

5 h) On sous-clone en utilisant la ou les enzymes correspondant au(x) site(s) de sous-clonage ménagé(s) dans le vecteur, puis éventuellement on séquence le gène.

10 L'invention concerne également, les banques mono- ou multi-digérées obtenues dans le procédé de l'invention et notamment aux étapes (c) et (f) des procédés ci-dessus, ainsi que les supports, tels que des tubes, des membranes, des plaques, des gels, etc... qui peuvent contenir lesdites banques, leur produit d'expression ou des hôtes les contenant.

15 L'invention se rapporte aussi aux hôtes cellulaires ou bactériens contenant les banques ci-dessus.

20 Un procédé de clonage par homologie selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a) On prépare une banque d'ADNc comme décrit à l'étape (a) précédente.

25 b) On digère la banque indépendamment par chacune d'au moins 10 et de préférence environ 70 enzymes de restriction.

c) On transforme les produits de la digestion de l'étape (b) dans des bactéries compétentes.

30 d) On fait pousser les bactéries transformées en milieu sélectif, de façon à produire des banques digérées débarrassées des produits clivés.

e) On clive séparément chacune de ces banques par la ou les enzymes correspondant au(x) site(s) de sous-clonage ménagé(s) dans le vecteur et l'on dépose séparément chacun de ces produits de digestion dans un puits de gel d'agarose ou d'acrylamide.

35

f) On fait migrer les produits de digestion de l'étape (e), puis l'on transfère sur membrane par exemple de nitro-cellulose, et l'on hybride avec une sonde spécifique du gène à cloner par homologie, ou bien
5 l'on dépose directement les produits de l'étape (d) sur une membrane de nitrocellulose.

g) On analyse la CEM du signal.

e) On fait les multi-digestions correspondantes, de façon à ce que le seul clone
10 résistant soit le vecteur portant le gène à cloner.

Le procédé de clonage par homologie ci-dessus peut être appliqué à l'identification :

a) d'allèles de différentes souches
15 d'animaux de la même espèce, ou de différents individus chez l'homme (souvent très homologues).

b) d'équivalents géniques présents chez différentes espèces (modérément homologues).

c) d'épissages alternatifs d'un même gène au
20 sein d'un même tissu ou entre différents tissus (homologie totale par sections).

d) de différents membres d'une famille génique, distribuée au sein d'un même tissus ou dans différents tissus. (homologie imprévisible, souvent très
25 forte dans certains domaines).

La version simplifiée de ce procédé consiste à effectuer des dots au lieu de Blots, c'est-à-dire à s'abstenir de cliver les banques mono-digérées par l'enzyme correspondant au site de sous-clonage ménagé
30 dans le vecteur, et de les déposer directement en un point sur une membrane de nitro-cellulose.

Un procédé de Southern Blot d'identification d'inserts selon l'invention permet d'identifier un
35 fragment d'ADN sans avoir à le séquencer même

partiellement. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

- 5 (a) on prépare une banque d'ADN susceptible de contenir ledit insert, consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :
- un ou deux sites pour la construction de la banque, et
 - 10 - éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner l'insert une fois celui-ci identifié et cloné.
- 15 b) On digère cette banque par chacune d'au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction.
- c) On transforme les banques monodigérés obtenues à l'étape (b) ci-dessus dans des bactéries compétentes, ou des hôtes équivalents.
- 20 d) On fait pousser les bactéries en milieu sélectif, de façon à produire des banques monodigérées débarassées des produits clivés.
- e) On clive séparément chacune de ces
- 25 banques par l'enzyme correspondant aux deux autres sites identiques et différent du premier ou des premiers site(s) et le(s) flanquant, et on dépose les produits de digestion dans les puits d'un gel d'agarose ou d'acrylamide.
- 30 f) On fait migrer ce gel et on le transfère sur une membrane par exemple de nitrocellulose.
- g) On utilise les inserts à identifier comme sondes marquées, soit un par un, soit plusieurs par plusieurs.
- 35 h) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (g) pour associer les inserts

à identifier à une CEM. Cette CEM correspond à l'action des enzymes de l'étape (b).

5 Un procédé d'étude du polymorphisme selon l'invention est identique au procédé de Southern Blot d'identification d'inserts mais est caractérisé en ce que :

10 - La banque d'ADN génomique de l'étape (a) est issue du sujet étudié, par exemple d'un malade, ou de sujets de la famille du malade.

- Les inserts utilisés comme sondes sont des marqueurs de polymorphisme déjà décrits.

15 Le procédé d'étude du polymorphisme selon l'invention trouve son application soit dans le cadre de la recherche de marqueurs du polymorphisme associés à une pathologie, soit dans le cadre d'un diagnostic de cette pathologie.

20 Une variante du procédé de clonage précédent pour l'étude du polymorphisme d'un individu comprend les étapes suivantes :

a) On définit la CEM de chacun des marqueurs connus de façon à permettre leur identification.

25 b) On constitue une banque d'ADN génomique du sujet étudié consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

30 - un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner l'insert une fois celui-ci identifié et cloné.

35

c) On effectue la digestion de la banque par des batteries d'enzymes correspondant aux CEM attribuées aux marqueurs étudiés.

5 d) On transforme les banques multidigérées dans des bactéries compétentes.

10 e) On cultive ces bactéries en milieu liquide ou solide contenant l'agent sélectif du plasmide. Si l'allèle recherché existe, les bactéries poussent, par contre, si cet allèle n'existe pas, elles ne poussent pas, et l'on dispose ainsi d'un profil pour chaque allèle.

15 Avantageusement, à l'étape (b), on prépare une banque dont les fragments ont une longueur moyenne de 1000 à 4000 et de préférence de 2000 nucléotides.

20 Un mode de réalisation de la variante ci-dessus permet également la détection des nombreux allèles de segments polymorphes, comme par exemple la gp120 des virus HIV ou la p53 d'oncogènes cellulaires, dans le cadre de travaux de recherche ou d'un diagnostic. Le segment concerné est avantageusement amplifié par PCR et cloné dans le plasmide, puis le procédé est identique à celui décrit précédemment et exposé en détail dans l'exemple 6 ci-après.

25 L'invention a aussi pour objet un mélange d'au moins 10 et de préférence de 50 à 70 enzymes de restriction susceptible d'être utilisé dans un procédé selon l'invention.

30 L'invention concerne encore l'utilisation d'un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

35 - un ou deux sites pour la construction d'une banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner des fragments dans ladite banque,
5 pour cribler une banque d'ADN.

L'invention a donc aussi pour objet une banque d'acide nucléique clonée dans un vecteur, susceptible d'être préparée dans un procédé décrit précédemment, caractérisé en ce que ledit vecteur est substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conserve :

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et
15 - éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner les fragments de la banque.
20

Avantageusement, ledit vecteur porte un système qui élimine tout vecteur seul refermé sur lui-même.

L'invention se rapporte aussi à :
25 - une banque d'ADN multi-digérée par un mélange d'enzymes décrit précédemment,
- groupe de banques d'ADN où chaque banque est mono-digérée indépendamment par chacune des enzymes du mélange d'enzymes décrit précédemment,
30 ainsi qu'aux hôtes cellulaires ou bactériens ou les supports contenant une banque ou un groupe de banques ci-dessus.

D'autres avantages et caractéristiques du procédé de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant à des exemples détaillés de mise
35

en oeuvre du procédé de l'invention dans diverses applications qui ne sauraient être considérés comme une limitation quelconque de l'invention.

5 Exemple 1 : La préparation et l'exploitation
d'une banque d'expression.

10 Une première application du procédé de l'invention se rapporte à la préparation et à l'exploitation d'une banque d'expression.

15 Cette technique suscite depuis le milieu des années 1980 un grand intérêt. De nombreux gènes, comme ceux codant pour des récepteurs aux cytokines, des marqueurs de surface des lymphocytes, des protéines liant l'ADN, etc... ont été identifiés par cette technique (U. Gubler et al., Annals of the N. Y. Academy of Science 795 : 36-40, 1996 ; D. Pennica et al. PNAS 92(4) : 1142, 1995 ; R. M. O'Brien et al., Biochemical Journal 312 : 17 - 21, 1995). Toutefois, les techniques de clonage par banque d'expression sont toujours fastidieuses et difficilement reproductibles à ce jour.

20 Les applications actuelles des banques d'expression concernent l'identification du gène codant pour une protéine, dont les moyens de mise en évidence peuvent être regroupés en quatre catégories principales :

- 25 - les anticorps,
 - les liaisons protéine/protéine autre qu'anticorps/antigène,
 - les oligonucléotides marqués par exemple
30 par fluorescence dans le cas où la protéine recherchée est une protéine se liant à l'ADN,
 - les tests d'activité de la protéine, quelle qu'elle soit.

35 La banque contenant le gène codant pour la protéine recherchée peut être transformée dans des bactéries ou des levures, et l'on utilise l'anticorps,

la protéine ou l'oligonucléotide marqué pour balayer la banque à la recherche de la colonie qui l'exprime. Ces systèmes marchent souvent très mal, car les protéines n'ont pas la même conformation et les mêmes modifications post-traductionnelles chez les bactéries ou levures et chez les cellules mammifères.

Le problème de la transfection de banques dans les cellules mammifères réside dans le fait que, à la différence des systèmes de bactéries ou de levures, plusieurs plasmides sont intégrés dans chaque cellule. Pour contenir cette difficulté, il est nécessaire d'utiliser des techniques de fractionnement successif des banques, ou de tris cytofluorimétriques répétés (T. Kitamura et al., PNAS 92 (20) : 9146, 1995 ; D. R. Gehlert et al., Molecular Pharmacology, 49 (2) : 224, 1996). Chacune de ces deux techniques représente un travail important, très long (plusieurs semaines), qui n'est pas toujours conclusif, et qui n'est pas adapté au clonage simultané deux inserts ou plus.

Le procédé de l'invention est beaucoup plus simple et moins coûteux que tous ceux de l'art antérieur cité ci-dessus. De plus, il peut être appliqué au clonage simultané de plusieurs inserts. Ce dernier point revêt une importance majeure lorsqu'on sait que beaucoup de protéines de surface sont composées de plusieurs chaînes et n'atteignent la surface que lorsque toutes les chaînes sont produites, par exemple dans le cas des complexes majeurs d'histocompatibilité. Or aucune des techniques de l'art antérieur basée sur les banques d'expression ne permet d'avoir accès à ces protéines.

Un procédé de l'invention pour la constitution de banques d'expression comprend les étapes suivantes :

a) On prépare une banque en insérant dans le site A du vecteur l'ADN complémentaire du tissu ou de la

lignée cellulaire d'intérêt. La figure 2 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

5 b) On vérifie la présence du gène recherché dans la banque en transfectant dans une lignée cellulaire qui n'a pas l'activité ou le phénotype recherché et en mesurant sa restauration, par exemple avec un anticorps, de façon à distinguer les cellules transfectées (+) des cellules non transfectées (-). La figure 4 et 5 en annexe sont une représentation schématique de cette étape.

10 Avantageusement, on utilise des cellules COS, classiquement mise en oeuvre pour les transfections.

15 c) On digère la banque indépendamment par chacune des 50 à 70 enzymes de restriction disponibles. On obtient ainsi 50 à 70 tubes. La figure 6 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

20 d) On transfecte indépendamment les 50 à 70 banques mono-digérées, et tester la présence de l'activité recherchée dans chacun de ces 50 à 70 lots de cellules transfectées. La figure 7 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

25 e) On établit ainsi la CEM de l'activité recherchée. Si la digestion par l'enzyme I n'altère pas l'activité de l'insert présent dans la banque, on notera I^R . Si elle l'altère, on notera I^S .

On obtient, dans l'exemple de la figure 7 en annexe, la CEM suivante: $I^S II^R \dots LXX^R$.

30 En moyenne, on estime que 55 ± 4 enzymes sur 70 auront un r, et 15 ± 4 auront un s pour un insert de 1 kb. En effet, la probabilité de clivage par une enzyme de restriction à site hexanucléotidique, à une position donnée prise au hasard, est $p = 1/4^6 = 1/4096$. Sur un gène dont la taille est n nucléotides, la probabilité théorique d'avoir 1, 2, 3, ... clivages suit une loi binomiale de probabilité p et de nombre d'évènements n.

35

La probabilité de n'avoir aucun clivage est $C_n^0 p^n (1-p)^0$. Dans le cas où $n = 1000$, on obtient une probabilité de 78,3%. La probabilité d'avoir un clivage ou plus est d'environ 21,7 %. Le nombre moyen d'enzymes ne clivant pas est donc de $0,783 \times 70 = 55$, et l'écart type est proche de 4.

5
10 f) On reprend la banque totale et on la digère sensiblement simultanément par les 55 enzymes qui n'affectent pas l'activité mesurée qui est associée à "r" pour l'insert recherché. La figure 8 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

15 En pratique, cette digestion ne peut être totalement simultanée pour des raisons de compatibilité de tampons, et l'on est obligé de 2 ou 3 multi-digestions successives correspondant aux deux ou trois tampons choisis.

20 La probabilité pour un insert pris au hasard d'être clivé par x de ces 55 enzymes suit aussi une loi binomiale, de probabilité 0,783 et de nombre d'évènements 55. La probabilité pour un insert de n'être clivé par aucune des 55 enzymes est donc $C_{55}^0 \times (0,783)^{55} \times (1 - 0,783)^0 = (0,783)^{55} = 1,4 \cdot 10^{-6}$.

25 Il ne reste donc, en moyenne, que l'insert recherché, plus $1,4 \cdot 10^{-6} \times 10^5 = 0,14$ insert parasite.

30 L'utilisation partielle de la CEM, correspondant uniquement aux enzymes associées à un r, est suffisante pour isoler le gène recherché, lequel est déjà pur à plus de 85%.

g) On transforme la banque multi-digérée dans des bactéries compétentes. Avantagement on étale sur petri et l'on vérifie par miniprep que les inserts sont bien sensibles aux enzymes notées "s" lors de l'établissement de la CEM. La figure 9 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

h) On sous-clone en utilisant l'enzyme B dans un vecteur d'étude, tel que Bluescript. Puis avantageusement on séquence.

5 Le modèle décrit à l'étape (e) ci-dessus est conforme à la réalité, mais ne représente qu'une moyenne. En effet, la probabilité de clivage varie d'une enzyme de type site hexanucléotidique à une autre.

10 Chacune de ces 8 étapes ne demande que très peu de temps, puisque le procédé ci-dessus devrait peut être réalisé en 16 jours dont 10 de travail.

15 Le procédé de l'invention permet notamment de générer des banques d'expression pour de nombreux tissus et lignées, puis en faire les 50 à 70 simples digestions, les transfecter, faire l'extrait cellulaire de ces cellules transfectées, et les déposer sur une membrane comme représenté à la figure 10.

20 Il ne reste alors plus qu'à révéler la membrane par exemple avec un anticorps selon la technique dite de Western blot, afin d'obtenir immédiatement la CEM de l'insert recherché comme représenté sur la figure 11. La banque est alors multi-
25 digérée en fonction de la CEM obtenue, puis on transforme des bactéries compétentes avec ce produit multi-digéré, et le gène est cloné en 3 jours au lieu de plusieurs mois par les techniques de l'art antérieur.

30 On peut conserver ces membranes ad vitam aeternam à 4°C ou congelées.

L'exemple ci-dessus est basé sur l'utilisation d'un anticorps spécifique mais d'autres systèmes de révélation du phénotype associé à la CEM peuvent être utilisés, comme un test enzymatique.

35

Exemple 2 : Le clonage par homologie.

Le clonage par homologie est intensivement utilisé par de très nombreux laboratoires de biologie moléculaire pour l'identification :

5 a) d'allèles de différentes souches d'animaux de la même espèce, ou de différents individus chez l'homme (souvent très homologues).

b) d'équivalents géniques présents chez différentes espèces (modérément homologues).

10 c) d'épissages alternatifs d'un même gène au sein d'un même tissu ou entre différents tissus (homologie totale par sections).

15 d) de différents membres d'une famille génique, distribuée au sein d'un même tissu ou dans différents tissus. (homologie imprévisible, souvent très forte dans certains domaines).

Les stratégies utilisées dans l'art antérieur sont essentiellement les deux suivantes (M. Parmentier et al., Nature, 355 : 453, 1992) :

20 - La PCR par homologie et ses dérivés, lesquels soulèvent le problème du choix des amorces alors que l'on ne connaît pas les parties conservées. La fenêtre entre le bruit de fond aspécifique et les vraies amplifications homologues est étroite. De plus, la
25 partie amplifiée ne représente le plus souvent pas tout le gène et on est alors obligé d'aller chercher les morceaux manquants, et notamment la partie en 5', par des techniques laborieuses comme la PCR ancrée.

30 - L'hybridation de banques existant actuellement. Cette méthode est efficace, mais nécessite beaucoup de travail. En outre, elle ne s'applique qu'à l'identification d'allèles (a) ou d'équivalents géniques (b). Pour l'identification des épissages alternatifs (c) ou des différents membres d'une famille génique (d), on
35 reclone toujours l'ADNc majoritaire, donc dans la plupart des cas, le gène dont on dispose déjà.

Le procédé de l'invention permet une fois qu'on a cloné un gène, de produire une sonde qui s'hybride sur des gènes homologues. On utilise donc cette sonde pour pêcher ses homologues par hybridation à faible stringence.

Le procédé de clonage par homologie selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a) On prépare une banque d'ADNc comme décrit à l'étape (a) de l'exemple 1.

b) On digère la banque indépendamment par chacune des 70 enzymes de restriction comme décrit à l'étape (c) de l'exemple 1.

c) On transforme ces 50 à 70 digestions dans des bactéries compétentes. La figure 12 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

d) On fait pousser les bactéries transformées en milieu sélectif, de façon à produire des grandes quantités des banques digérées débarrassées des produits clivés (non transformants en raison de leur linéarisation). Les éléments clivés sont désormais absents des banques. La figure 13 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

e) On clive séparément chacune de ces banques par l'enzyme B. La figure 14 en annexe est une représentation schématique de cette étape.

On dépose alors séparément chacun de ces 50 à 70 produits de digestion dans un puits de gel d'agarose, comme représenté à la figure 15 en annexe.

Puis, on fait migrer, l'on transfère sur nitro-cellulose, et l'on hybride avec la sonde, comme représenté à la figure 16 en annexe.

f) On analyse la CEM du signal. Ainsi, si une bande est présente dans la piste "banque non digérée", mais absente dans la piste "banque digérée par

I", c'est que l'insert hybridé est sensible à l'enzyme I, et ainsi de suite.

5 g) On fait les multi-digestions correspondantes, et le seul plasmide résistant est le plasmide recherché. Avantageusement, on peut ensuite faire des minipreps avec ce plasmide en utilisant les enzymes "s" pour confirmer.

10 Ce procédé peut être utilisé industriellement, en proposant les Blots correspondant à de nombreuses banques, comme celles réalisées dans l'exemple 1. Ainsi, en disposant de la sonde et des Blots judicieusement choisis, il devient quasi immédiat de trouver tous les allèles, correspondants d'espèce, épissages alternatifs et isotypes (deux jours de travail, sans compter le séquençage).

15 Une version simplifiée de ce procédé consiste à effectuer des Dots au lieu de Blots, c'est-à-dire à s'abstenir de cliver les banques mono-digérées par l'enzyme B, et à les déposer directement en un point sur une membrane de nitro-cellulose. Lors de l'hybridation avec la sonde, les points générant un signal, par exemple radioactif, correspondraient aux enzymes pour lesquelles le plasmide serait résistant. Ceux ne retenant plus de signal correspondraient aux enzymes pour lesquelles l'insert est sensible. L'analyse est alors proche de celle développée dans l'exemple 1, comme représentée aux figures 17 et 18 en annexe.

20
25
30 Cette version simplifiée est cependant insuffisante pour cloner des isotypes ou des épissages alternatifs exprimés dans une même cellule.

35 Exemple 3 : Southern Blot d'identification "identiblot".

Les applications précédentes du procédé de l'invention visent à simplifier et rendre plus rapide le clonage par expression ou par homologie et en offrant de nouvelles possibilités.

5 Le Southern Blot d'identification propose un raccourci qui faciliterait les travaux du chercheur impliqué dans les techniques de clonage moléculaire.

10 En effet, Le cas est fréquent dans l'art antérieur où une stratégie de clonage aboutit à l'obtention de nombreux inserts, parmi lesquels se trouve le gène recherché et de nombreux parasites. Or dans l'art antérieur, pour identifier un insert parmi tous ces parasites, il est indispensable de le séquencer, au moins partiellement, ce qui représente un travail considérable. Le séquençage est une technique fastidieuse et trop puissante pour ce simple usage d'identification d'inserts, en effet la lecture de 15 nucléotides suffit le plus souvent à identifier un insert. Une technique moins puissante, mais moins fastidieuse, utilisant la DMD, pourrait lui être substituée.

20 Ainsi, comme décrit précédemment, il est possible de faire des Southern Blots de banques d'ADN génomique de façon industrielle. Une représentation schématique de la préparation d'une telle banque d'ADN génomique est donnée à la figure 3 en annexe. Ce Southern Blot, rebaptisé "identiblot" dans le cadre de la présente invention est suffisamment informatif pour permettre l'identification du fragment d'ADN homologue de la sonde.

30 Ce southern blot est même cent millions de fois trop informatif. En effet, la banque génomique est constituée de 4 millions d'inserts différents de 1 kb de long. Pour les mêmes raisons que celles exposées précédemment, un insert pris au hasard sera résistant à 35 55 enzymes sur 70 et sensible à 15. Le nombre de

combinaison enzymatique possible est donc C_{70}^{15} , soit $70!/(55!15!) = 7,2 \cdot 10^{14}$. Ce nombre est plus de cent millions de fois supérieur à la taille de la banque. Le fait de considérer que les inserts ont tous une taille différente ajoute encore des possibilités. Chaque insert de la banque est donc associé à une CEM originale.

Ce procédé présente un intérêt majeur dans le cas de stratégies de clonages aboutissant à de forts taux de clones faux positifs, par exemple dans les cas de l'utilisation de banques soustractives ou de stratégies de clonage par insertion.

En effet, à partir des cinquante clones étudiés, il suffit de préparer une "sonde multiplex", c'est à dire un marquage commun de cinquante inserts (dans un seul tube), et une seule hybridation du filtre de nitro-cellulose. On obtient l'identité des cinquante inserts d'un seul coup, en comparant leurs CEM avec celles préalablement entrées dans une base de données informatique.

La figure 19 en annexe représente un exemple où trois sondes A, B, et C ont été utilisées simultanément. Les inserts génomiques correspondant à des CEM non décrites, et eux seuls, seront clonées par exemple par multi-digestion, puis séquencés.

A l'inverse du cas des banques d'ADNc, dont la variété est insondable, il est suffisant de produire un seul type de Blot, pour chacune des 10 espèces étudiées couramment en biologie : humain, souris, rat, drosophile, tabac, levure, etc...

Exemple 4 : Etude du polymorphisme humain.

Les travaux de recherche menés dans le cadre de l'étude du polymorphisme nécessitent l'utilisation

d'un nombre croissant de marqueurs génétiques. Leur utilisation dans le cadre du diagnostic des maladies génétiques est également en forte augmentation. Il est probable que dans un futur proche des cartes personnelles de prédisposition génétique pourront être établies, de façon à ce que chacun évite de s'exposer à certains risques environnementaux, comme le tabac en cas de prédisposition au cancer du poumon, le sucre pour les terrains diabétiques, etc....

Les techniques disponibles dans l'art antérieur permettant d'étudier le polymorphisme sur un allèle sont principalement la PCR, le Southern Blot et l'étude des marqueurs de l'ADN satellite (potentiellement utilisés en combinaison). La méthode de l'invention constitue donc une alternative, plus efficaces, à ces techniques.

La mise en oeuvre du procédé de clonage selon l'invention pour l'étude du polymorphisme humain est proche de celle de l'exemple 3 ci-dessus. La différence majeure réside dans le fait qu'il est nécessaire de réaliser la banque, ses digestions, la migration sur gel et le transfert sur membrane, pour chaque sujet.

Ce procédé permet également de localiser très rapidement l'origine d'une maladie génétique par l'analyse des différents membres de la famille hébergeant la pathologie. Dans une famille dite "à risque" pour une pathologie, il convient de faire les Identiblots correspondant aux différents membres de la famille, et de les tester au moyen de polysondes faites à partir des marqueurs génétiques déjà existants. En un jour, on peut hybrider au moins vingt membranes, soit obtenir l'allèle de 1000 marqueurs. Les facteurs génétiques multiples pourraient être définis avec cette technique.

Cette application du procédé de l'invention implique un investissement en temps de l'ordre de

plusieurs heures de travail, mais est rapidement rentabilisé par la possibilité de tester les marqueurs de prédisposition génétique 50 par 50, au moyen de sondes multiplex préparées en routine et constituées du nombre équivalent de marqueurs.

Exemple 5 : Deuxième approche de l'étude du polymorphisme humain selon l'invention.

Cette seconde mise en oeuvre du procédé de l'invention à l'étude du polymorphisme concerne l'application de la DMD à l'étude des marqueurs génétiques par RFLP. Le procédé selon l'invention comprend alors les étapes suivantes :

a) On a préalablement définis la CEM de chacun des marqueurs connus de façon à permettre leur identification. Cette identification est faite une fois pour toutes et un polymorphisme est donc caractérisé par une variation de la CEM.

b) On constitue une banque d'ADN génomique du sujet étudié dans le vecteur précédemment décrit. Comme indiqué précédemment, il peut être avantageux que les vecteurs seuls ligés sur eux-mêmes soient éliminés. Avantageusement, on prépare une banque dont les fragments ont une longueur moyenne de 2000 nucléotides.

c) On effectue la digestion de la banque par des batteries d'enzymes correspondant aux CEM attribuées aux marqueurs étudiés.

Ainsi, par exemple, dans le premier puits, on met les cinquante enzymes qui vont digérer toute la banque sauf un premier marqueur. Dans le second puits, on met une autre batterie d'enzymes pour un second marqueur, etc...

d) On transforme les banques multidigérées dans des bactéries compétentes.

5 e) On cultive en milieu solide (boite de petri) contenant l'agent sélectif du plasmide de façon à ce que si l'allèle recherché existe, les bactéries poussent. Par contre, si cet allèle n'existe pas, elles ne poussent pas. On dispose ainsi d'un profil pour chaque allèle, et l'on peut étudier un nombre illimité de marqueurs en une seule fois.

10 Ce procédé peut être automatisé en préparant des plaques de 96 puits contenant tous les mélanges enzymatiques, ces plaques sont stockées en congélateur. Différents types de plaques pourraient être produites:

- Marqueurs répartis sur tout le génome.
- Marqueurs répartis sur un seul chromosome.
- Marqueurs répartis sur une région précise.
- 15 - Marqueurs reliés aux risques de pathologies.
- Etc...

20 On distribue dans chaque puits une quantité fixe d'ADN sous forme de banque, puis l'on incube à 37°C pour les digestions. On rajoute alors les bactéries compétentes, et on suit le mécanisme classique de transformation (choc thermique, incubation sans agent de sélection, etc...). On prélève à la pipette 96 canaux et l'on dépose sur un pétri. La lecture est effectuée à l'oeil ou à l'aide d'un spectrophotomètre.

25 Cette seconde approche offre l'avantage d'être facilement automatisable, et confère à grande échelle un gain de temps très important. En effet, il faut tester un grand nombre de marqueurs pour chaque individu, car la création de la banque représente un investissement en travail. En outre, elle permet de s'exonérer de toute radioactivité, coûteuse et nocive.

35 Exemple 6 : Troisième approche de l'étude du polymorphisme humain selon l'invention.

Cette variante du procédé d'étude du polymorphisme humain selon l'invention se rapporte à l'application de la DMD à l'étude des différents allèles d'un seul marqueur.

5 Dans l'art antérieur, ces différenciations se font essentiellement par séquençage. Dans un futur proche, les puces d'ADN (T. Pastinen et al., Genome Research 7 : 606-14, 1997 ; J. G. Hacia et al., Nature Genetics, 14 : 441, 1996), permettront d'automatiser ces
10 travaux. Ceux-ci sont particulièrement utiles dans le cas de l'examen de la gp120 du virus HIV ou d'oncogènes cellulaires tels p53, présents sous de nombreux allèles.

Conformément à la présente invention, cette
15 variante consiste à préalablement définir la CEM de chacun des allèles du segment étudié. Cette identification est réalisée une fois pour toute et se limite aux allèles comportant au moins un site de restriction de différence. Puis on amplifie par PCR le fragment étudié. On clone ledit fragment dans le vecteur
20 de l'invention. Ce procédé est donc très proche de celui de l'exemple 5, mais avec une banque comportant seulement un ou deux inserts correspondant aux deux copies du gène présent chez un individu. La suite de ce procédé est identique à celle de l'exemple 5.

25 Ce travail peut être réalisé simultanément sur plusieurs inserts à la fois.

REVENDICATIONS

1) Procédé de clonage d'un fragment d'acide
nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend les étape
5 suivantes :

- on prépare une banque d'ADN susceptible de
contenir ledit fragment d'acide nucléique à cloner,

10 - on crible ladite banque en utilisant de
façon combinatoire au moins 10 et de préférence 50 à 70
enzymes de restriction, pour isoler par tout moyen
approprié le clone contenant ledit fragment.

2) Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que la préparation de la banque d'ADN
15 susceptible de contenir le fragment d'acide nucléique à
cloner, consiste à insérer chacun des fragments d'ADN
d'un échantillon dans un vecteur substantiellement
dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de
restriction mais conservant :

20 - un ou deux sites pour la construction de
la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites,
et de préférence seulement deux sites, identiques ou
non, et différent du ou des premiers sites et le(s)
25 flanquant, utiles pour sous-cloner le fragment d'acide
nucléique une fois celui-ci identifié et cloné.

3) Procédé de clonage d'un fragment d'acide
nucléique selon l'une des revendications 1 à 2,
30 caractérisé en ce qu'il comprend les étape suivantes :

(a) on prépare une banque d'ADN susceptible
de contenir le fragment d'acide nucléique, consistant à
insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans
un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de
35 clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner le fragment d'acide nucléique une fois celui-ci identifié et cloné.

(b) On réalise la digestion en parallèle de la banque par plusieurs enzymes de restriction, au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction de façon obtenir autant de banques mono-digérées que d'enzymes utilisées.

(c) On transfecte indépendamment les banques mono-digérées dans des hôtes cellulaires appropriés de façon à obtenir des lots correspondant d'hôtes cellulaires.

(d) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (c) pour évaluer l'intégrité du fragment d'acide nucléique à cloner et ainsi établir sa CEM.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(e) On reprend la banque totale de l'étape (a) et on la digère sensiblement simultanément par les enzymes qui n'affectent pas l'intégrité du fragment d'acide nucléique à cloner.

(f) On isole le clone résistant contenant le fragment d'acide nucléique à cloner par tout moyen approprié et éventuellement on le sous-clone en utilisant les deux sites ménagés dans le vecteur à cet effet.

(g) On séquence éventuellement le fragment d'acide nucléique cloné.

5) Procédé selon les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il comprend entre les étape (a) et (b) l'étape suivante :

5 (a') on vérifie la présence du fragment d'acide nucléique à cloner dans la banque en transfectant dans un hôte cellulaire qui n'a pas ledit fragment et en testant par tout moyen approprié la présence du fragment dans ledit hôte.

10 6) Procédé selon les revendications 4 et 5, caractérisé en ce qu'il comprend entre les étape (e) et (f) l'étape suivante :

15 (e') On transforme la banque multi-digérée de l'étape (e) dans des hôtes compétents, de façon à vérifier la nature des fragments clonés.

20 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce la banque d'ADN contient de 1 à 10^8 et de préférence de l'ordre de 10^5 à 4.10^6 fragments différents de l'ordre de 0,1 kb à 5 kb chacun, et de préférence de l'ordre de 1 à 2 kb.

25 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que les tests réalisés aux étapes (d) et/ou (a') pour vérifier l'intégrité de la séquence d'acide nucléique à cloner sont tout moyen de mise en évidence soit de la séquence elle-même, comme une sonde, soit de la protéine codée par ladite séquence, tel qu'un ligand comme un anticorps, ou encore de l'activité de cette protéine, 30 comme un marqueur enzymatique, qui peuvent être détectées par tout moyen connu de l'homme du métier, comme un marquage fluorescent ou radioactif.

35 9) Procédé de clonage d'un gène par banque d'expression selon l'une quelconque des revendications 1

à 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) On prépare une banque d'ADNc susceptible de contenir ledit gène en insérant dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et
10 - éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner le gène une fois celui-ci identifié et cloné.

15 b) On vérifie la présence du gène recherché dans la banque en transfectant dans une lignée cellulaire qui n'a pas l'activité ou le phénotype recherché et en mesurant sa restauration de façon à distinguer les cellules transfectées des cellules non transfectées.

20 c) On digère la banque indépendamment par au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction.

d) On transfecte indépendamment les banques mono-digérées de l'étape (c).

25 e) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (d) pour la présence de l'activité associée au gène à cloner et on évalue l'intégrité de la séquence dudit gène afin d'établir la CEM de l'activité associée audit gène.

30 f) On reprend la banque totale de l'étape (a) et on la digère sensiblement simultanément par les environ 50 à 55 enzymes qui n'affectent pas l'activité mesurée à l'étape (e).

35 g) On transforme la banque multi-digérée dans des bactéries compétentes.

h) On sous-clone en utilisant l'enzyme correspondant au site de sous-clonage ménagés dans le vecteur, puis éventuellement on séquence le gène.

5 10) Procédé de clonage par homologie selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 (a) on prépare une banque d'ADN susceptible de contenir ledit fragment d'acide nucléique, consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

15 - un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner le fragment d'acide nucléique une fois celui-ci identifié et cloné.

20 b) On digère la banque indépendamment par chacune d'au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction.

25 c) On transforme les produits de la digestion de l'étape (b) dans des bactéries compétentes.

d) On fait pousser les bactéries transformées en milieu sélectif, de façon à produire des grandes quantités des banques digérées débarrassées des produits clivés.

30 e) Eventuellement on clive séparément chacune de ces banques par l'enzyme correspondant au site de sous-clonage ménagé dans le vecteur et l'on dépose séparément chacun des produits de digestion dans un puits de gel d'agarose.

35 f) f) On fait migrer les produits de digestion de l'étape (e), puis l'on transfère sur

membrane par exemple de nitro-cellulose, et l'on hybride avec une sonde spécifique du gène à cloner par homologie, ou bien l'on dépose directement les produits de l'étape (d) sur une membrane de nitrocellulose.

5

g) On analyse la CEM du signal.

e) On fait les multi-digestions correspondantes, de façon à ce que le seul vecteur résistant soit le vecteur portant le gène à cloner.

10

11) Application du procédé selon la revendication 10 à l'identification :

- d'allèles de différentes souches d'animaux de la même espèce, ou de différents individus chez l'homme,

15

- d'équivalents géniques présents chez différentes espèces,

- des épissages alternatifs d'un gène.

- de différents membres d'une famille génique.

20

12) Procédé de Southern Blot d'identification d'inserts mettant en oeuvre un procédé de clonage d'une séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25

(a) on prépare une banque d'ADN susceptible de contenir ledit insert, consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

30

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s)

35

flanquant, utiles pour sous-cloner l'insert une fois celui-ci identifié et cloné.

5 b) On digère cette banque par chacune d'au moins 10 et de préférence environ 50 à 70 enzymes de restriction.

c) On transforme les banques monodigérés obtenues à l'étape (b) ci-dessus dans des bactéries compétentes, ou des hôtes équivalents.

10 d) On fait pousser les bactéries en milieu sélectif, de façon à produire des banques digérées débarassées des produits clivés.

15 e) On clive séparément chacune de ces banques par la ou les enzymes correspondant au(x) site(s) de sous-clonage flanquant le ou les sites de construction de la banque, et on dépose les produits de digestion dans les puits d'un gel d'agarose ou d'acrylamide.

f) On fait migrer ce gel et on le transfère sur une membrane par exemple de nitrocellulose.

20 g) On utilise les inserts à identifier comme sondes marquées, soit un par un, soit plusieurs par plusieurs.

25 h) On teste par tout moyen approprié chacun des lots obtenus à l'étape (g) pour les associer à une CEM.

30 13) Procédé d'étude du polymorphisme mettant en oeuvre un procédé de Southern Blot d'identification d'inserts selon la revendication 12, caractérisé en ce que :

- La banque d'ADN génomique de l'étape (a) est issue du sujet étudié.

- Les inserts utilisés comme sondes sont des marqueurs de polymorphisme.

35

14) Procédé d'étude du polymorphisme caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) On définit la CEM de chacun des marqueurs connus de façon à permettre leur identification par le procédé de clonage selon la revendication 3.

10 b) On constitue une banque d'ADN génomique du sujet étudié consistant à insérer chacun des fragments d'ADN d'un échantillon dans un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

- un ou deux sites pour la construction de la banque, et

15 - éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner l'insert une fois celui-ci identifié et cloné.

20 c) On effectue la digestion de la banque par des batteries d'enzymes correspondant aux CEM attribuées aux marqueurs étudiés.

d) On transforme les banques multidigérées dans des bactéries compétentes.

25 e) On cultive ces bactéries en milieu liquide ou solide contenant l'agent sélectif du plasmide. Si l'allèle recherché existe, les bactéries poussent, par contre, si cet allèle n'existe pas, elles ne poussent pas, et l'on dispose ainsi d'un profil pour chaque allèle.

30 15) Mélange d'au moins 10 et de préférence de 50 à 70 enzymes de restriction susceptible d'être utilisé dans un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

16) Utilisation d'un vecteur substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

5 - un ou deux sites pour la construction d'une banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner des fragments dans ladite banque,

10 pour cribler une banque d'ADN.

17) Une banque d'acide nucléique clonée dans un vecteur susceptible d'être préparée dans un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que ledit vecteur est substantiellement dépourvu de tout site de clivage par des enzymes de restriction mais conservant :

20 - un ou deux sites pour la construction de la banque, et

- éventuellement au moins deux autres sites, et de préférence seulement deux sites, identiques ou non, et différent du ou des premiers sites et le(s) flanquant, utiles pour sous-cloner les fragments de la banque.

18) Une banque selon la revendication 16, caractérisée en ce que le vecteur porte un système qui élimine tout vecteur seul refermé sur lui-même.

19) Une banque d'ADN selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle est multi-digérée par un mélange d'enzymes selon la revendication 15.

35

20) Un groupe de banques d'ADN selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle est mono-digérée indépendamment par chacune des enzymes du mélange d'enzymes selon la revendication 15.

5

21) Les hôtes cellulaires ou bactériens contenant une banque ou un groupe de banques selon l'une des revendications 19 ou 20.

10

22) Support portant une banque ou un groupe de banques selon l'une des revendications 19 ou 20 ou des hôtes cellulaires selon la revendication 21.

Fig.1

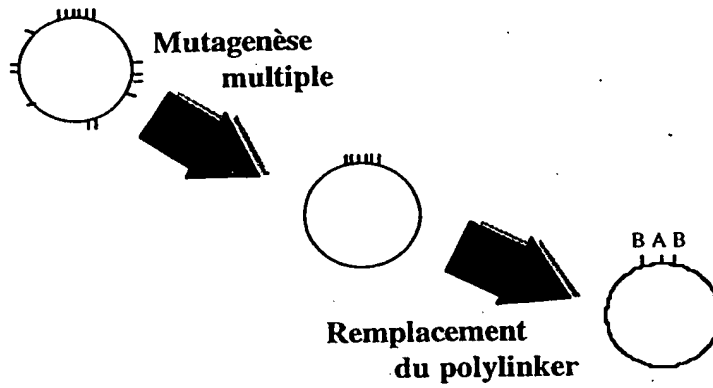


Fig.2

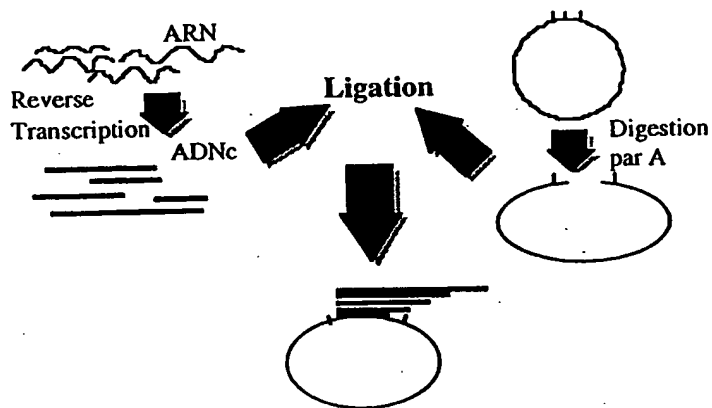


Fig.3

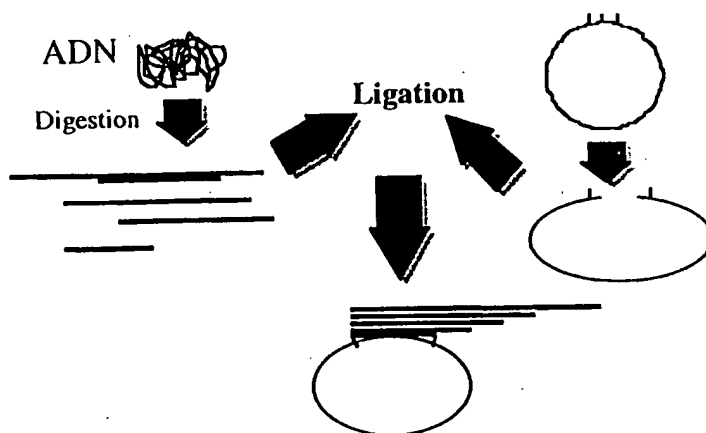


Fig.4

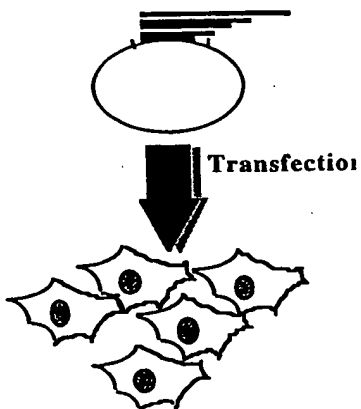


Fig.5

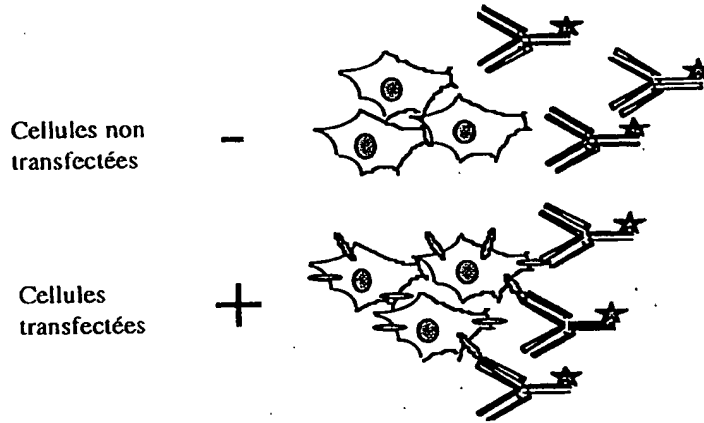


Fig.6

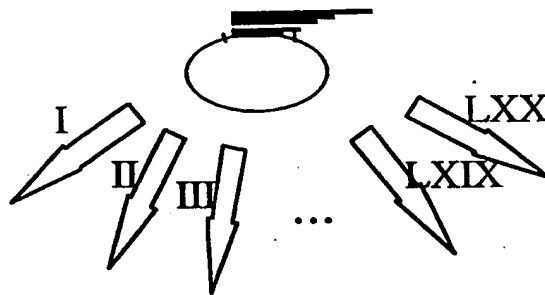


Fig.7

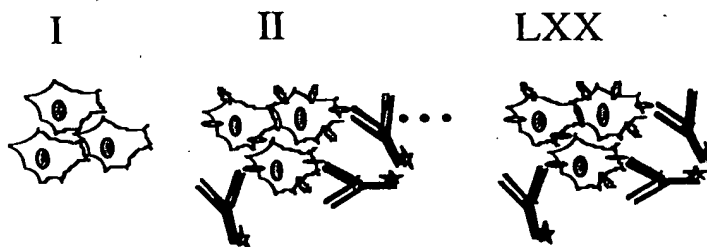


Fig. 8

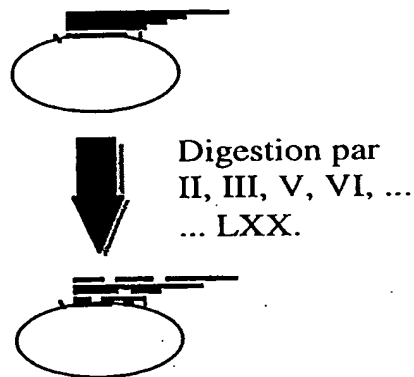


Fig. 9

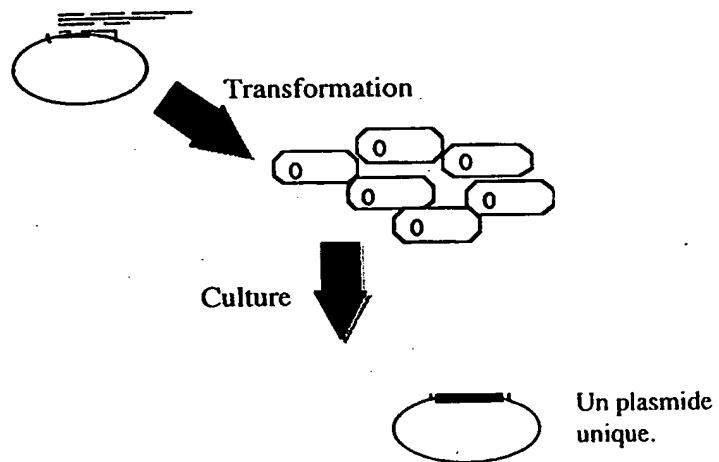
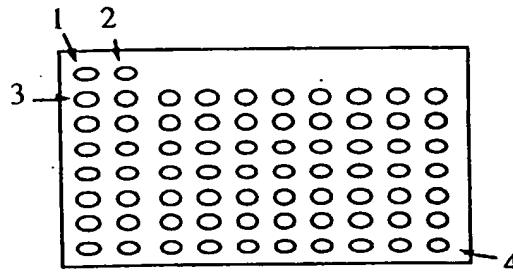
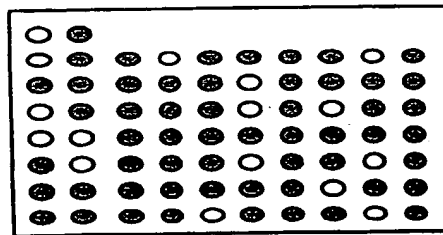


Fig.10



- 1: Extrait cellulaire de cellules non transfectées.
- 2: Extrait cellulaire de cellules transfectées par la banque totale.
- 3: Extrait cellulaire de cellules transfectées par la banque digérée par I.
- 4: Extrait cellulaire de cellules transfectées par la banque digérée par LXX.

Fig.11



CEM: FIFIFIV^SV^rVI^r...LXIX^SLXX^r.

Fig.12

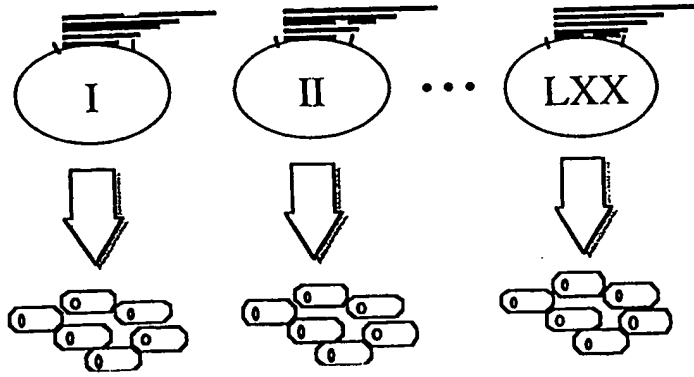


Fig.13

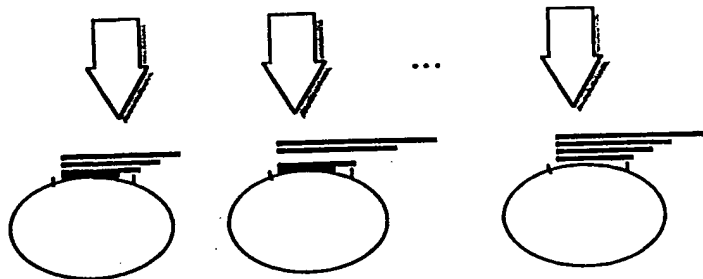


Fig.14

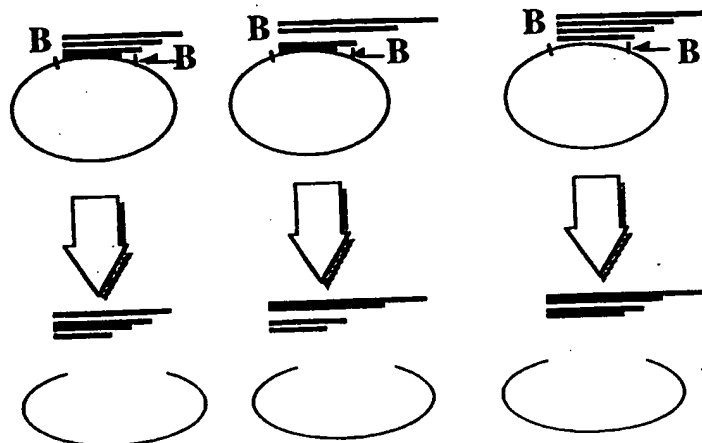
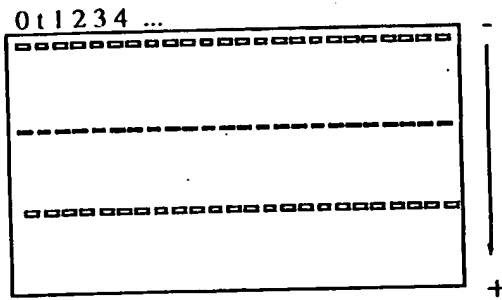
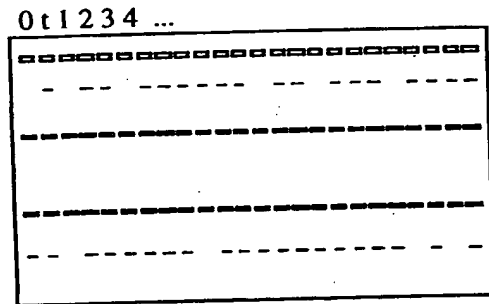


Fig.15



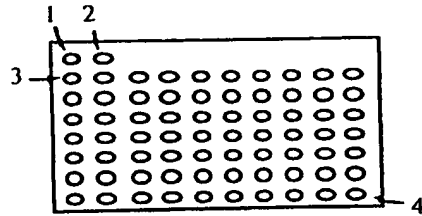
0: Plasmide seul (clivé B) †: Banque totale.
1: Banque clivée par I. 2: Banque clivée par II.

Fig.16



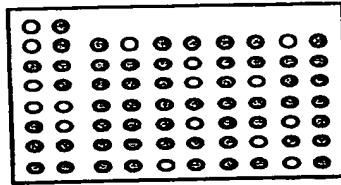
CEM: I'II'III'IV'V'VI'r...LXIX'LXXr.

Fig. 17



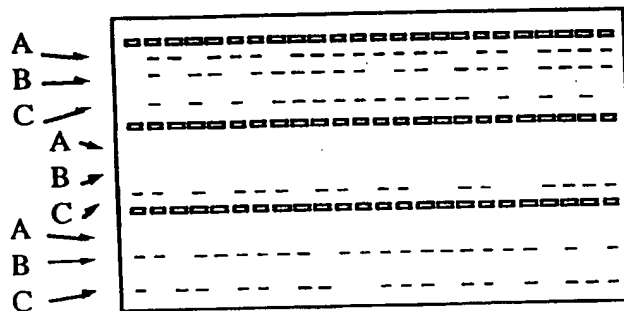
- 1: préparation d'ADN plasmidique de bactéries transformées par le plasmide seul.
- 2: préparation d'ADN plasmidique de bactéries transformées par la banque totale.
- 3: préparation d'ADN plasmidique de bactéries transformées par la banque digérée par I.
- 4: préparation d'ADN plasmidique de bactéries transformées par la banque digérée par LXX.

Fig. 18



CEM: I^{III}I^{III}I^{IV}V^VVI^r...LXIXLXX^r.

Fig. 19



CEM: A: I^{III}S^{III}I^{IV}V^r...
 B: I^{SI}I^{III}I^{IV}S^s...
 C: I^{SI}I^{III}S^{IV}V^r...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/10 C12N1/21 C12N9/22 C12N15/70 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONES D.H. ET AL.: "Production of a vector to facilitate DNA mutagenesis and recombination" BIOTECHNIQUES, vol. 16, no. 4, 1994, pages 694-701, XP002076171 cited in the application see page 700, column 1 see figure 6	1-22
A	DENG W.P. & NIKOLOFF J.A.: "Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 200, 1992, pages 81-88, XP002096494 see the whole document en particulier page 82, colonne 1	1-22
-/--		

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search 12 March 1999	Date of mailing of the international search report 29/03/1999
---	---

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Galli, I
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02629

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GALLI ET AL.: "Mammalian genomic sequences can substitute for the SV40 AT stretch in sustaining replication of the SV40 origin of replication" FEBS LETTERS, vol. 318, no. 3, March 1993, pages 335-340, XP002096461 see page 336, column 1 see figure 1</p>	1-22
A	<p>MAJUMDER K ET AL: "Recombinant enrichment by exploitation of restriction sites with interrupted palindromes: design, synthesis and incorporation of zero-background linkers in cloning and expression vectors" GENE, vol. 151, no. 1, 30 December 1994, page 147-151 XP004042627</p>	1-22
A	<p>WO 95 04745 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 16 February 1995 see page 6 - page 7 see claims 1,4</p>	1-22
A	<p>US 5 252 724 A (KISHIMOTO TOSHIHIKO ET AL) 12 October 1993 see abstract see column 2, line 53 - column 3, line 2</p>	1-22
A	<p>AMERSHAM LIFE SCIENCE CATALOGUE 1994 pages 164-165 XP002076172 see the whole document</p>	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9504745 A	16-02-1995	US 5500356 A	19-03-1996
		CA 2169283 A	16-02-1995
		EP 0713494 A	29-05-1996
		JP 9501321 T	10-02-1997
		US 5759778 A	02-06-1998
US 5252724 A	12-10-1993	CA 2042808 A	18-11-1991
		DE 69105811 D	26-01-1995
		DE 69105811 T	18-05-1995
		EP 0457343 A	21-11-1991
		JP 4228075 A	18-08-1992
		RU 2060278 C	20-05-1996

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. de Recherche Internationale No

PCT/FR 98/02629

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/10 C12N1/21 C12N9/22 C12N15/70 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JONES D.H. ET AL.: "Production of a vector to facilitate DNA mutagenesis and recombination" BIOTECHNIQUES, vol. 16, no. 4, 1994, pages 694-701, XP002076171 cité dans la demande voir page 700, colonne 1 voir figure 6	1-22
A	DENG W.P. & NIKOLOFF J.A.: "Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 200, 1992, pages 81-88, XP002096494 voir le document en entier en particulier page 82, colonne 1 --- -/-	1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 12 mars 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 29/03/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Galli, I

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de Propriété Industrielle No

PCT/FR 98/02629

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>GALLI ET AL.: "Mammalian genomic sequences can substitute for the SV40 AT stretch in sustaining replication of the SV40 origin of replication" FEBS LETTERS, vol. 318, no. 3, mars 1993, pages 335-340, XP002096461 voir page 336, colonne 1 voir figure 1</p>	1-22
A	<p>MAJUMDER K ET AL: "Recombinant enrichment by exploitation of restriction sites with interrupted palindromes: design, synthesis and incorporation of zero-background linkers in cloning and expression vectors" GENE, vol. 151, no. 1, 30 décembre 1994, page 147-151 XP004042627</p>	1-22
A	<p>WO 95 04745 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 16 février 1995 voir page 6 - page 7 voir revendications 1,4</p>	1-22
A	<p>US 5 252 724 A (KISHIMOTO TOSHIHIKO ET AL) 12 octobre 1993 voir abrégé voir colonne 2, ligne 53 - colonne 3, ligne 2</p>	1-22
A	<p>AMERSHAM LIFE SCIENCE CATALOGUE 1994 pages 164-165 XP002076172 voir le document en entier</p>	15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 98/02629

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9504745 A	16-02-1995	US 5500356 A	19-03-1996
		CA 2169283 A	16-02-1995
		EP 0713494 A	29-05-1996
		JP 9501321 T	10-02-1997
		US 5759778 A	02-06-1998
US 5252724 A	12-10-1993	CA 2042808 A	18-11-1991
		DE 69105811 D	26-01-1995
		DE 69105811 T	18-05-1995
		EP 0457343 A	21-11-1991
		JP 4228075 A	18-08-1992
		RU 2060278 C	20-05-1996